

ネコ海馬 θ 波の発現機序

第2報 θ 波の層的解析

笠羽 敏 治

札幌医科大学生理学第2講座 (主任 青木 藩 教授)

The Mechanisms of the Hippocampal Theta Generation in Cats

II. Laminar Analysis of the Theta Waves

Toshiharu KASABA

Department of Physiology (Section 2), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. M. Aoki)

We have previously reported that somatosensory stimulation and electrical stimulation (rectangular pulses of 0.3 msec duration, 200 Hz) applied to the brain stem, hypothalamus and lower part of the septum elicited hippocampal theta waves (3-4 Hz) in cats. In the present experiment, I analyzed the depth distribution and phase changes of the two theta waves using a monopolar tungsten electrode and a multi-electrode made of four tungsten wires of 150 μ m diameter insulated except for the tips. The electrode tips were separated by 0.5-1.5 mm in the vertical direction. The cats were anesthetized with urethane (initial dosage of 100-200 mg/kg, I. V.).

Depth profile analysis using monopolar tungsten electrodes showed two amplitude maxima of theta activity in the dorsal hippocampus. One smaller amplitude peak (100-200 μ V) was located around the pyramidal cell layer and the other larger peak (150-400 μ V) was located around the granule cell layer in the dentate gyrus. Depth profile analysis, using a multi-electrode, confirmed two amplitude maxima and revealed that these two theta waves were approximately 180° out of phase. There was no correlation between the amplitudes of these two theta waves ($r=0.01-0.3$). Septal stimulation produced a reciprocal potential change immediately after stimulation, a positive wave (300 msec duration, 200 μ V) around the pyramidal cell layer, and a negative wave (600 msec duration, 400 μ V) around the granule cell layer in the dentate gyrus. Rhythmic theta waves were observed to succeed these potential changes. We also analyzed correlations between the theta waves of bilateral hippocampi. Theta waves of bilateral dentate gyri or pyramidal cell layers were synchronized and in phase. However, there were only weak correlations between the amplitudes of the theta waves of bilateral dentate gyri ($r=0.36-0.51$) and pyramidal cell layers ($r=0.26-0.43$).

I further analyzed the participation of hippocampal neurons in the theta waves using tungsten microelectrodes. Hippocampal theta units which discharge synchronously with the theta waves were about 15% (3/20) around the pyramidal cell layer and 14% (4/28) in the dentate gyrus.

These results suggest that a common rhythm generator may exist within the septum from which its output is fed into two hippocampal generator zones; the pyramidal cell layer and the granule cell layer.

(Received September 5, 1984 and accepted September 25, 1984)

Key words: Hippocampus, Theta wave, Septum, Phase, Correlation

1 緒 言

私共は、第1報¹⁾において、ウレタン浅麻酔下のネコを用い、体性感覚刺激および視床下部、中隔下部などの電気刺激によって、再現性のある規則的な海馬徐波(type IIの θ 波、3-4 Hz)を生起させうることを報告した。この海馬 θ 波は、錐体細胞層付近と歯状回の顆粒細胞層をとりかこむ部位の2か所で大きな振幅で導出記録されるとみなされた。 θ 波の海馬内の記録部位については、すでに体性感覚刺激および視床下部の電気刺激により、ラット^{2,3)}、ラビット^{4,5)}、ネコ⁶⁾などで、錐体細胞層付近と歯状回で大きな振幅で導出記録できることが報告されている。この場合、Bland *et al.*⁵⁾ Winson⁷⁾は、両部位で記録される θ 波の位相が逆転していること、CA1領域だけ破壊しても歯状回で θ 波が記録できることなどから、錐体細胞層付近と歯状回の2か所に θ 波の生起部位を考える仮説、即ちtwo generator hypothesisを提唱している。

θ 波の生起のためには、海馬内の規則的な電位変動が生ずる事が必要である。そのためのリズム発生装置について、第1報では、中隔-海馬系が重要な役割を果す事を報告した。海馬内の電位変動について、Bland *et al.*⁸⁾ Fujita and Sato⁹⁾は、CA1領域の錐体細胞および歯状回の顆粒細胞の中には、海馬 θ 波と同期してスパイク発射をするものがあることを報告している。従って、海馬 θ 波の生起には、これらの2か所のニューロン群における興奮性または抑制性シナプス電位、およびそれらの加重にもとづくニューロンのスパイク発射が関与しているとみなされる。海馬内のシナプス電位の発生については、海馬への有力な入力経路となっている中隔経由の入力線維、および大脳梨状皮質(entorhinal cortex)からの穿通線維(perforant pathway)を刺激して調べた報告¹⁰⁻¹³⁾がなされているが、シナプス電位が θ 波の生起にどのように関与しているのかよくわかっていない。

そこで、本研究では前報に引きつづき、海馬 θ 波の発現機序を解明するため、まず θ 波が海馬内のどこで生起されるかについてより詳細に調べ、つぎに、海馬内の2か所で大きく記録される θ 波の位相と振幅の相関関係を解析した。さらに、 θ 波の生起にシナプス電位およびニューロンの発射がどの様に関与しているのかを明らかにしようとした。そのために次の4点について解析を行った。(1)体性感覚刺激および中隔下部などの連続電気刺激により生起される海馬 θ 波について層解析(laminar analysis)を行い、海馬内の層構造

と明確な対応関係があるのかどうか。(2)錐体細胞層付近と歯状回の顆粒細胞層付近の2か所で記録される θ 波について、位相関係および振幅の相関関係を調べ、いわゆるtwo generator hypothesisが支持されるかどうか。(3)シナプス電位の関与を知るため、中隔下部または視床下部の電気刺激後、海馬 θ 波がどのような電位変動の過程を経て生起されるのか。(4) θ 波とニューロンのスパイク発射を同時に導出記録し、 θ 波の位相と同期を示すニューロン発射がどの程度存在するか。

動物にはネコを用い、浅いウレタン麻酔下に実験を行った。

なお、本研究の一部はすでに発表済みである^{14,15)}。

2 実験方法

2.1 標本の作製

実験には親ネコを23匹(2.5-4.5 kg)用いた。標本は第1報で報告したのと同様に、ウレタン浅麻酔下に不動化し、人工呼吸器に接続して維持した。ウレタン投与量は、初回量100-200 mg/kgを静脈内投与し、30 mg/kgを約1時間ごとに追加投与した。ネコを脳定位固定装置に固定し、電気刺激のため、中隔と視床下部の上部の頭頂骨に、および海馬 θ 波の記録のため、背側海馬上の頭頂骨にそれぞれハンドドリル(Falcon II, モリタ)で小孔をあけた。その他の一般的条件は、第1報の場合と同様にした。

2.2 刺激および記録方法 (Fig. 1)

体性感覚の刺激として、手指で前後肢、耳介、背中をなぞる(stroke)、またはピンセットで軽くはさむ(pinching)などの刺激を加えた。中隔下部および視床下部で電気刺激を行うための刺激用電極は、双極タングステン電極を用いた。電気刺激は、電子管刺激装置(日本光電、MSE-3 R および SEN-7103)を用いて、持続0.3 msecの矩形波電流を、周波数100-300 Hz、強さ4-8 Vの範囲で加えた。

海馬 θ 波の記録用電極には、カシュー塗料で絶縁し先端のみ露出したシングルの単極タングステン電極(直径150 μ m, 抵抗0.2-0.5 M Ω)を用いた。さらに、同時にいくつかの深さで導出記録するために、単極タングステン電極を、先端を0.5-1.5 mmずつずらして4本並べてはり合わせたマルチ電極(multi-electrode)を用いた。このとき、不関電極は共通にし、頸部の皮膚面においた。4チャンネルのマルチ電極で導出記録される海馬脳波は、ポリグラフ(三栄測器、360 システム、生体信号増幅器1253)を用い記録した。通常、時定数は0.3秒とし、カットオフ周波数100 Hzのフィルター

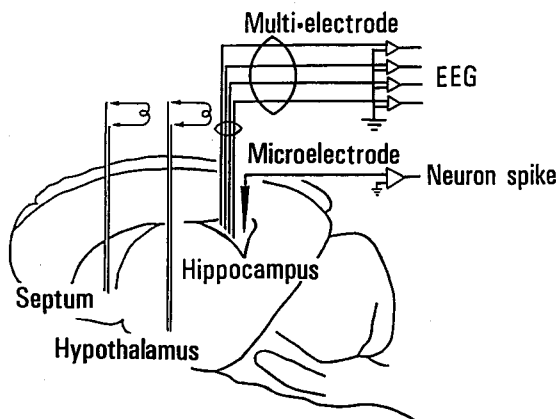


Fig. 1 Schematic diagram of the stimulation and recording set-up. Hippocampal EEG was recorded with monopolar tungsten electrodes and multi-electrodes. Hippocampal unit activity was recorded with tungsten microelectrodes. Electrical stimuli were applied to the hypothalamus and the septum with bipolar tungsten electrodes.

を通した。紙記録は、熱ペン式レクタグラフで行った。ニューロンのユニット発射活動を記録するためには、絶縁塗料(Insl-X)で絶縁し、先端のみ露出したタングステン微小電極、または、タングステンをガラス管内に挿入し、先端のみ5-10 μm 露出させた、ガラス管封入微小電極(抵抗2-5 M Ω)を使用し、細胞外記録した。この電極をマニピュレーター(ナリング、SM-15型)を用いて、脳定位アトラス¹⁶⁾にもとづき背側海馬内に刺入した。ユニット発射活動は、前置増幅器(W-P社、DAM 5 A)から主増幅器(日本光電、AVH-10)を通し、オシロスコープ(日本光電、VC 10)で観察した。海馬 θ 波と同時記録する時には、単極電極で導出された θ 波を、生体信号増幅器(日本光電、AVB-10)を通し、ニューロンのユニット発射と同時にオシロスコープで観察した。海馬 θ 波、およびニューロンのユニット発射は、ロングレコーディングカメラ(日本光電、RLG-6201)でオシロスコープより直接撮影記録し、さらに必要に応じ磁気テープレコーダ(TEAC. XR 30)に同時記録し、off-line で解析した。

2.3 データー分析

4 チャンネルのマルチ電極により導出記録される θ 波が、それぞれ、どの程度独立して生起されているのかを知るため、電極の2か所で記録される θ 波の振幅の相関関係を調べた。一側の錐体細胞層付近の2か所の θ 波どうし、歯状回内の2か所の θ 波どうし、および、

錐体細胞層付近と歯状回の両部位のそれぞれ互に対応する20個の θ 波の振幅を測定し、振幅値をX-Y座標にプロットし、回帰直線を描き、さらにその相関係数を求めた。左右の錐体細胞層付近の θ 波、および歯状回の θ 波の振幅についても同様にして相関係数を求めた。相関係数の有意差の検定は、 $t = \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$ (n : サンプル数, r : 相関係数 ρ の母集団から n 個取り出したサンプルから算出したサンプルの相関係数) の式で得られる t の値が、自由度 $n-2$ の t 分布にしたがうことを利用して、母集団の相関係数が $\rho=0$ でたるとする帰無仮説をたて、有意水準 0.05 ($p < 0.05$) で検定することで行った。

ニューロン発射と θ 波の位相関係の解析には、歯状回の θ 波の1周期を基準にして、10周期を陰性ピークを一致させて重ねて表示し、その下にニューロン発射の時点点を点で表わし、1周期ごとにずらして表わす、いわゆるドットラスタ表示し、さらに bin 幅 0.08 秒で10周期のスパイク数をヒストグラムで表した。

2.4 刺激および記録部位の同定

実験終了後、多量のネプタールを投与し sacrifice した。刺激および記録電極はそのままの位置で留置し、電極先端の位置は後で組織学的に確かめた。ホルマリンを含んだ脱脂綿で露出した脳全体をおおい、翌日電極をつけたまま硬化した脳をとり出した。さらに、10%ホルマリンで1~2週間固定したのち、背側海馬の前額断の凍結切片(60 μm)を作製した。染色はCresyl violetで行った。これらの標本を実体顕微鏡で観察し、刺激および記録電極のトラックおよび電極の先端の位置を同定するようにした。層構造との対応は、この先端の位置を基準とし、記録したマニピュレーターの目盛からトラック上の θ 波およびニューロン発射の記録部位を、海馬の前額断面上で求めた。

3 成 績

3.1 海馬 θ 波の記録部位と層構造

5例で、まずシングル電極を用い単極導出法により、海馬 θ 波の導出記録部位と海馬層構造との対応関係を調べた。電極が背側海馬を通過し、記録部位が組織学的に確認された4例において、ほぼ同様の成績が得られた。記録電極が、前後方向(A-P)のA4.0で、正中線から5 mm 外側(L5.0)で錐体細胞層のCA1領域を電極が垂直に通過した代表的な1例をFig. 2に示す。この例は耳介をpinchingする体性感覚刺激により、海馬 θ 波の振幅が大きく記録される部位が2か所あるとみなされた。すなわち、1か所は錐体細胞層のすぐ上

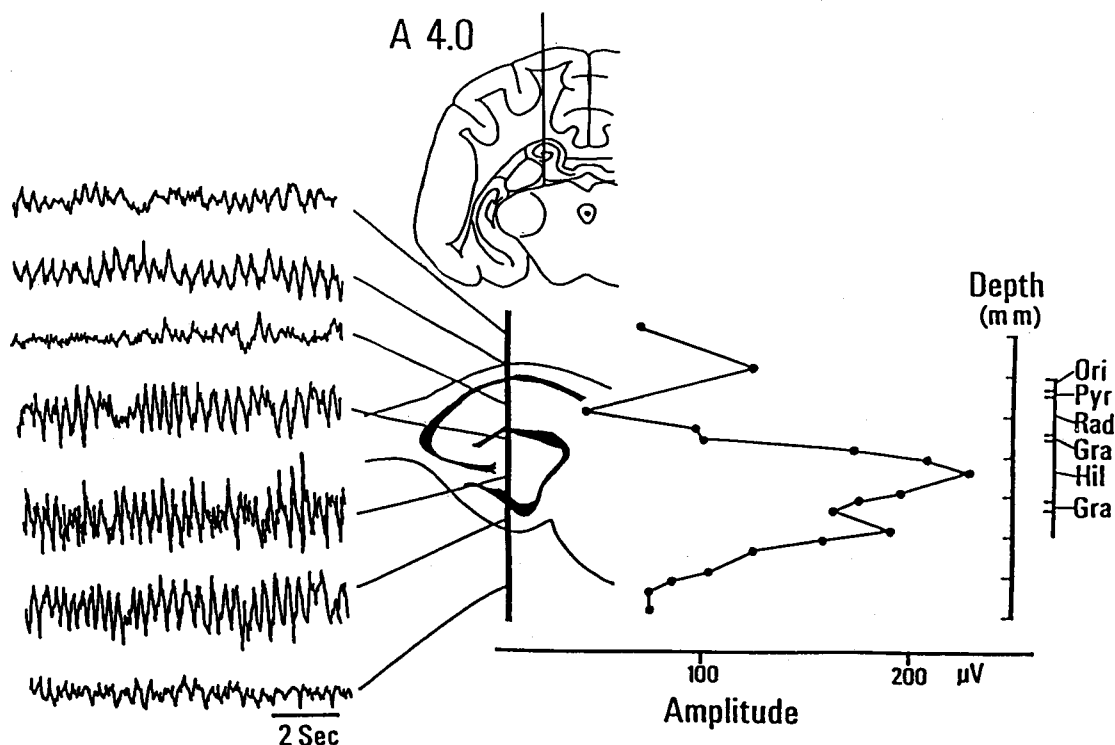


Fig. 2 Depth distribution of hippocampal EEG in a CA1-dentate section. Upper inset is a diagrammatic representation of a transverse section containing an electrode penetration through the hippocampus at A 4.0 level. Left side records show the EEG activity at each point of the electrode track connected by straight lines. Right side graph indicates the depth amplitude profile of hippocampal EEG recorded from various points. Scale and corresponding cell layers are shown at the far right. Ori-stratum oriens. Pyr-pyramidal cell layer. Rad-stratum radiatum. Gra-granule cell layer. Hil-hilus.

層であり、この部位で、約 3 Hz で、振幅約 130 μV のやや低振幅の θ 波が導出記録された。もう 1 つは歯状回の顆粒細胞層付近であり、約 3 Hz で、振幅約 220 μV の比較的高振幅の θ 波が導出記録された。この場合、弯曲した顆粒細胞層の中央部ではやや振幅が小さくなり、歯状回内で 2 峰性のピークを示した。錐体細胞の腹側部の放線状層 (stratum radiatum) では、 θ 波がほとんど導出記録されない部位があり、いわゆる null zone とみなされた。

つぎに、 θ 波が導出記録される海馬内部位について、内外側方向の分布を調べた。体性感覚刺激を加え、記録電極を L 4.0 から外側方向 L 8.0 まで 1 mm の間隔で順次移動させた 5 本の電極トラックで、深さ 500 μm 毎に記録した θ 波の振幅を調べた代表的な 2 例を Fig. 3 A, B に示す。両例ともほぼ同様の傾向を示した。錐体細胞層付近では、振幅 100–150 μV の θ 波が導出記録された。この下方、錐体細胞層の下縁に沿い、L 4.0、

5.0、6.0、7.0 の 4 本のトラックで明らかに示されているように、 θ 波のほとんど記録できない null zone があった。歯状回の背側の顆粒細胞層にそって振幅 150–300 μV の大きな θ 波が導出記録された。顆粒細胞層の内側の中央部では、背側、外側に比較して振幅の低下が認められた。歯状回の腹側の顆粒細胞にそって 150–250 μV の θ 波が記録された。歯状回の方で海馬をはずれると θ 波の振幅は 100 μV 以下となり、不規則な徐波に移行した。海馬をはずれた上方では 1–3 Hz の不規則な徐波で、規則的な θ 波とははっきり区別された。B 例の組織標本を下方に示した。Cresyl violet で染色した標本で、錐体細胞層と顆粒細胞層が黒く弯曲した層として明確に識別できた。中隔下部に連続電気刺激を加えて θ を記録した場合でも、記録部位の分布は同様であった。

3.2 マルチ電極による海馬 θ の同時記録

つぎに、海馬内で導出記録される θ 波の位相関係を

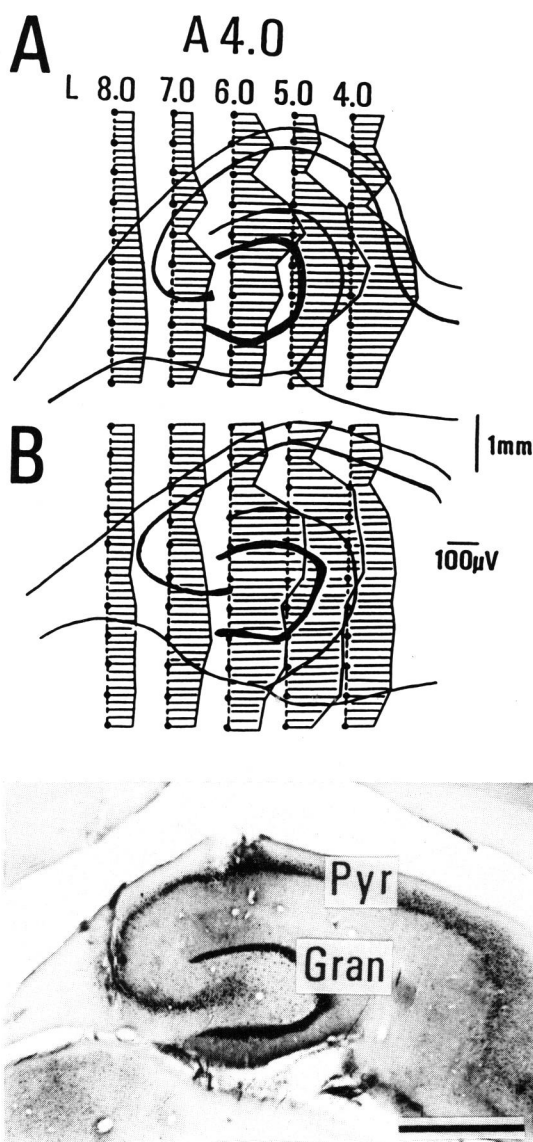


Fig. 3 Drawings of depth distributions of hippocampal EEG in five different tracks at A 4.0. Filled circles show the recording points and shaded areas indicate the amplitude profiles of the hippocampal EEG. Lower photomicrograph is the same histological section of B. Scale: 2 mm.

明らかにしようとした。そのために、7例で4チャンネルのマルチ電極を用いて同時記録した。4本電極のため組織破壊を伴いやすく、全チャンネルから安定して θ 波が導出記録されたのは、7例中5例であった。中隔下部に連続電気刺激を加え、マルチ電極で θ 波が導出記録された代表例をFig. 4に示す。まず図中の右側に示さ

れている各電極ごとの θ 波の振幅と、層構造との対応をみると、海馬 θ 波は、錐体細胞層付近では振幅100–200 μ Vであった。歯状回では250–350 μ Vと歯状回の方がより大きな振幅で導出記録され、顆粒細胞層の内側で数十 μ Vの振幅の低下を示した(●印)。Fig. 4の左側に示されているように、2番目の電極(▲印)からは θ 波が導出記録されず、いわゆる null zone に対応しておりシングル電極で得られた成績と同様であった。深さの異なる4本電極で同時に導出記録された θ 波についてみると、周波数はいずれも約3 Hzで同期していたが、位相はnull zoneを境として、錐体細胞層付近(△印)と歯状回(□, ●印)で記録された θ 波の位相が逆転した関係にあることがわかった。

そこで、4チャンネルで同時記録した θ 波について、位相の関係をさらに詳細に調べた代表例をFig. 5およびFig. 6に示す。Fig. 5において、上から2および3番目の電極(電極番号2, 3)より歯状回で導出記録された θ 波は、振幅はそれぞれ170 μ V, 220 μ Vと差はあるが、位相はほぼ一致し、波形も類似していた。このとき、一番上方の錐体細胞層付近で導出記録された θ 波(電極番号1)は、振幅は約100 μ Vで小さく、歯状回の θ 波とは位相が約180度ずれていた。Fig. 6は、マルチ電極が海馬のやや外側よりを通った例である。錐体細胞層のCA3の付近で導出記録される上方の2つの θ 波(電極番号1, 2)と、歯状回で導出記録される下方の2つの θ 波(電極番号3, 4)はそれぞれ波形が類似し、位相も同位相であった。しかし、錐体細胞層付近と歯状回で導出記録される θ 波の位相は、やはり180度ずれて逆転しているとみなされた。

ここで、実際に記録される θ 波は、速波成分が重なり θ 波の位相関係を調べる上で支障があるので、 θ 波の位相のずれをより明確にするため、原波形をフィルターを通して記録した場合の例をFig. 7に示す。10 Hz以上のはやい周波数成分をカットし、 θ 波成分をはっきりさせた場合(Fig. 7 B)は、約3 Hzの錐体細胞層付近の θ 波の陰性ピークと歯状回の θ 波の陽性ピークがほぼ一致し、位相が約180度ずれていることが明確になった。

3.3 一側の海馬内から導出記録される θ 波の振幅の相関関係

3例で、海馬内の2か所で位相が逆転した関係で生じられる θ 波の振幅が、どの程度独立して変動しているのかを調べた。マルチ電極を用いて、海馬の錐体細胞層付近および歯状回から同時に θ 波を導出記録して、それぞれの θ 波の振幅の相関関係を解析した。中隔下部

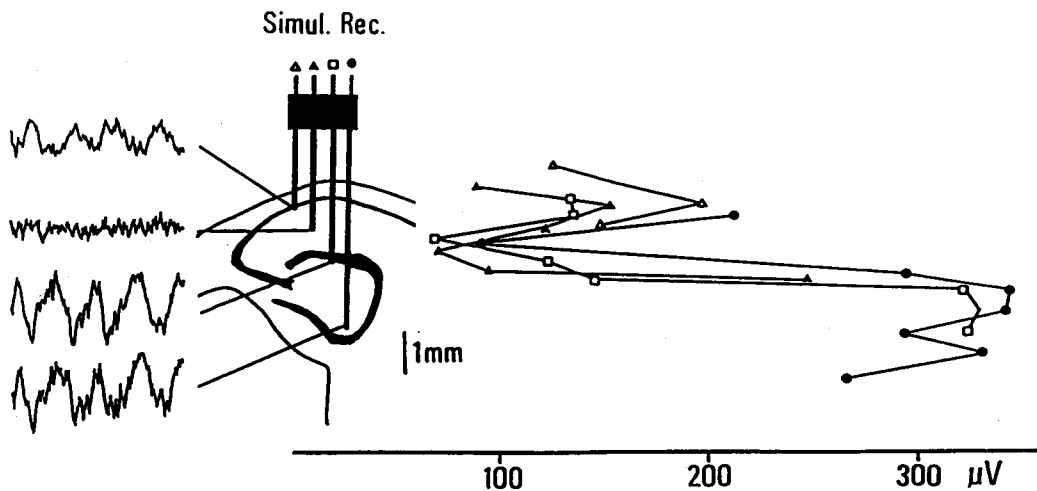


Fig. 4 Simultaneous recording of the hippocampal EEG using a multi-electrode. Left side records show the activity at each tip point of the multi-electrode. Right side graph indicates the amplitude of hippocampal EEG recorded from each electrode track. Solid circle, open square, solid triangle, open triangle correspond to each electrode.

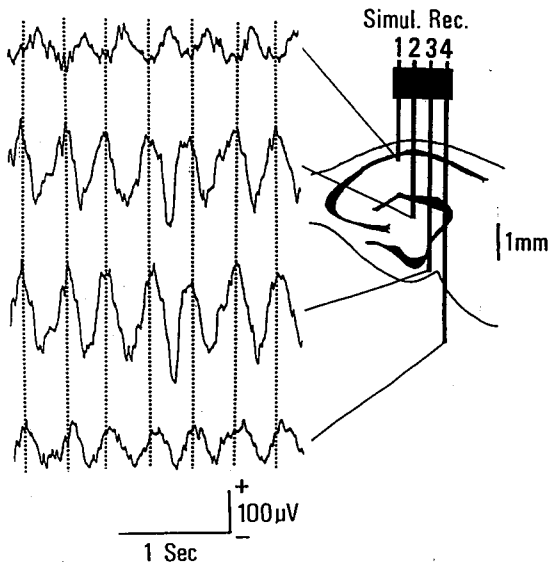


Fig. 5 Depth distribution and phase relations of hippocampal theta waves in a CA1-dentate area. Left side theta waves were recorded simultaneously at each point of the tips (1, 2, 3, 4) of a multi-electrode. Dotted vertical lines are drawn to facilitate the comparison of the phase relation of the theta waves.

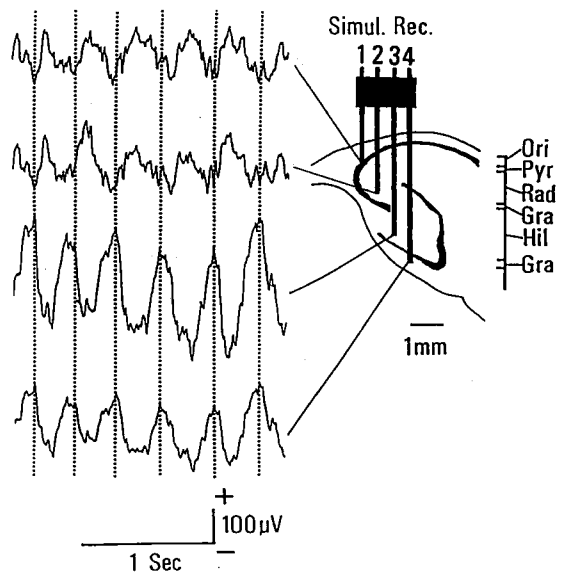


Fig. 6 Depth distribution and phase relations of hippocampal theta waves in a CA3-dentate area. Format is the same with Fig. 5.

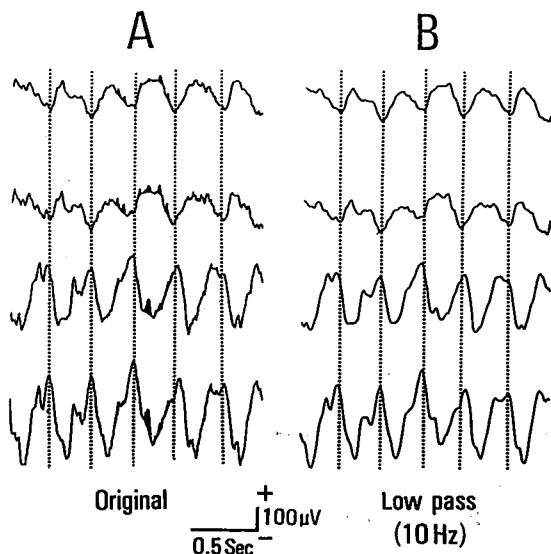


Fig. 7 Analysis of frequency components of the hippocampal theta waves. A, B are the same records of the theta waves. A: original theta waves. B: through a low pass filter. Shaded areas in A indicate the fast activity over 10 Hz. Upper two traces were recorded around pyramidal cell layer, while lower two traces were recorded in the dentate gyrus.

に連続電気刺激を加えて生起させた θ 波について調べた代表例を Fig. 8 に示す。錐体細胞層付近の θ 波どうし、および歯状回の θ 波どうしは、同位相の振幅をそれぞれ計測した。錐体細胞層付近と歯状回の θ 波の比較は逆転した位相になっている振幅を計測し、相関関係を調べた。錐体細胞層付近の θ 波どうしの相関係数 (Fig. 8 C) は $r=0.82$ 歯状回の θ 波どうしの相関係数 (Fig. 8 B) は $r=0.92$ と両者とも高い相関関係を示した。これに対し、位相の逆転した両部位の θ 波の振幅の相関係数 (Fig. 8 D) は $r=0.04$ ($p<0.05$) と相関関係は認められなかった。

体性感覚刺激、視床下部の電気刺激で生起された θ 波についても、ほぼ同様の成績が得られた。すなわち、刺激方法の違いにかかわらず、錐体細胞層付近の θ 波どうしの振幅の相関係数は $r=0.82-0.90$ (平均 0.83)、歯状回どうしでは $r=0.81-0.92$ (平均 0.87) といずれも高い相関を示した。これに対し、錐体細胞層付近と歯状回の 2 か所、位相の逆転した θ 波どうしの振幅の相関係数は $r=0.01-0.3$ (平均 0.12) と低い相関関係しか得られなかった。これらの成績から、錐体細胞層付近と歯状回の顆粒細胞層付近で導出記録される θ

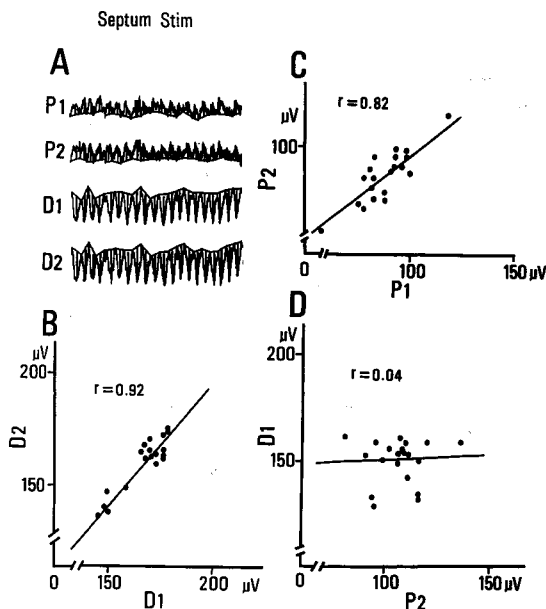


Fig. 8 Correlations between the amplitudes of two theta waves. A: Four channel hippocampal theta waves recorded using a multi-electrode. P1 and P2 theta waves were recorded in the pyramidal cell layer and D1 and D2 waves were recorded in the dentate gyrus. B, C, D: Correlations between the amplitudes of D1-D2, P1-P2 and P2-D1. Correlation coefficients are indicated in each graph.

波は、位相はほぼ逆転した関係を保ちながら、それぞれ振幅は独立した変動をして生起していることがわかった。

3.4 左右の海馬 θ 波の相関関係

左右の背側海馬で同時記録される θ 波の対応関係についてみると、左右の錐体細胞層付近どうし、および歯状回どうしの θ 波は同期し、位相は同位相であった。つぎに、3 例で左右の海馬 θ 波の振幅の相関関係を調べた。中隔下部に連続電気刺激を加えて生起させた θ 波について調べた代表例を Fig. 9 に示す。左右の錐体細胞層付近の θ 波どうしの振幅の相関係数 (Fig. 9 A) は $r=0.43$ で、左右の歯状回の θ 波どうしの相関係数 (Fig. 9 B) は $r=0.41$ であった。錐体細胞層付近の θ 波どうしの相関係数は、 $r=0.26-0.43$ (平均 0.35) および歯状回の θ 波どうしの相関係数は $r=0.36-0.51$ (平均 0.43) で、いずれも、5%の危険率では有意な相関を示さなかった。このことから、左右の海馬の錐体細胞層付近の θ 波どうし、および歯状回の θ 波どうしは、同期して同位相であるが、ほぼ独立した振幅で変動しているとみなされた。

3.5 海馬 θ 波の生起過程

つぎに、3例で同側海馬内の錐体細胞層付近と歯状回の両部位の θ 波が、どのような経過で生起されるのかを解析した。中隔下部に連続電気刺激を加え、4本のマルチ電極で各部位から θ 波を導出記録した代表例を Fig. 10 に示す。錐体細胞層付近と歯状回において、刺激後相反する変化を示した。即ち、刺激開始直後、錐体細胞層付近では陽性に振れ、約 300 msec で陰性に振れ、約 600 msec から約 3 Hz の θ 波に移行した。一方、歯状回では逆に、刺激後陰性に大きく振れ、約 600 msec でもとにもどり θ 波に移行するとみなされた。再現性を確かめるために、刺激を加えてからの経過を数回刺激点に重ね合わせて表示した (Fig. 11)。刺激後数百 msec と比較的是やく θ 波に移行する場合もあるが、いずれの場合も錐体細胞層付近では陽性に、歯状回では陰性に振れてから後律動的な θ 波へと移行した。他

Fig. 9 Correlations between the amplitudes of bilateral theta waves which synchronized and in phase. A, B: Correlations between the amplitudes of bilateral theta waves of pyramidal cell layers and dentate gyri. Correlation coefficients are indicated in each graph.

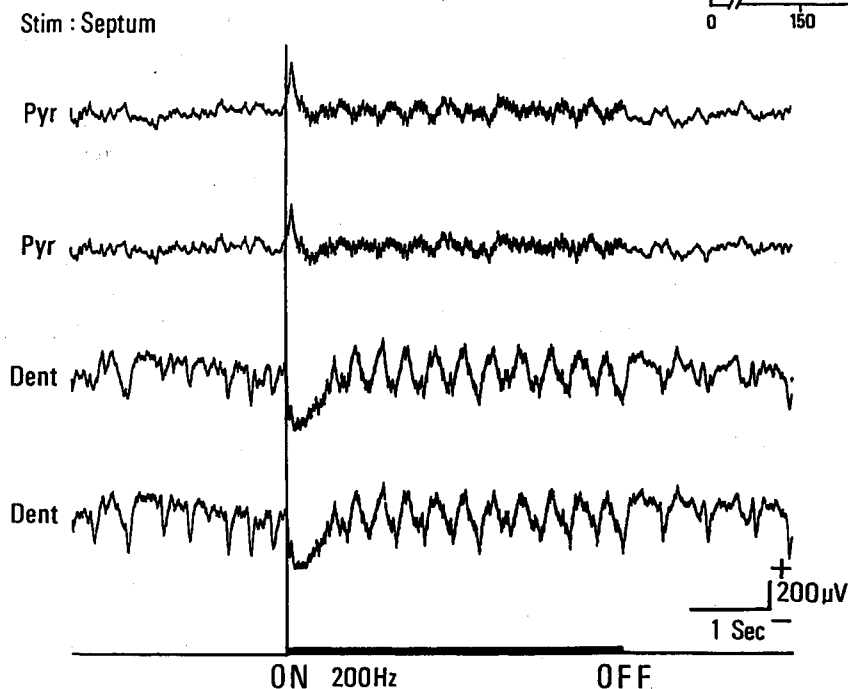
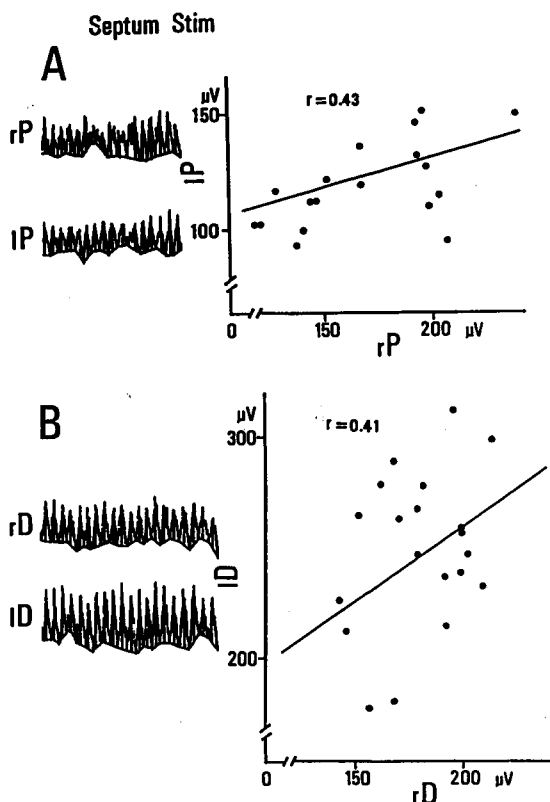


Fig. 10 Reciprocal potential changes and the theta waves following septal electrical stimulation. Four channel hippocampal theta waves were recorded using a multi-electrode. Upper two theta waves were recorded from the pyramidal cell layer and lower two theta waves were recorded in the dentate gyrus. Horizontal black bar indicates the duration of stimulation and vertical line indicates the onset of stimulation.

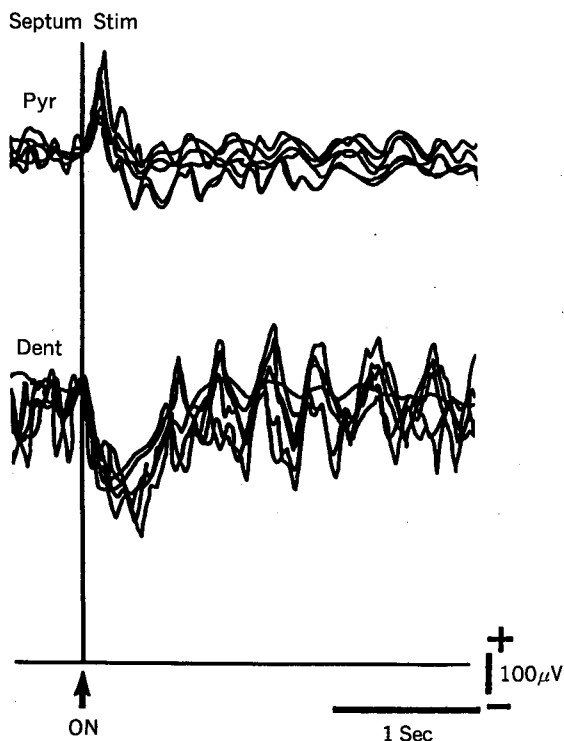


Fig. 11 Time course of generation of the theta waves following septal stimulation. Vertical line is the onset of stimulation and six traces are superimposed.

の2例でも同様の時間関係で、やはり刺激後陽性、陰性の相反する振れを示し、規則的な θ 波へと続いた。

3・6 海馬 θ 波とニューロン発射活動との関係

錐体細胞層付近および歯状回から θ 波と同期して発射するニューロンのユニット活動の有無を調べた。高振幅で導出記録される歯状回の θ 波を基準として、その位相と同期するニューロンの発射活動を調べた。明らかに歯状回の θ 波と同期した群発射を示したニューロンの個数は、錐体細胞層付近で15%($N=3/20$)、歯状回で14%($N=4/28$)であった。Fig. 12にそれぞれの部位での例を示す。錐体細胞層付近の3個のユニットと歯状回の4個のユニットについての成績をFig. 13に示す。基準とした歯状回の θ 波は、陰性のピークを開始点として一致させて10回重ね合わせた。それぞれの周期の θ 波の位相に対応して発射したスパイクを点で表わし、その下に並べて表示した。これによると、錐体細胞層付近のユニットは、歯状回の θ 波が陽性にふ

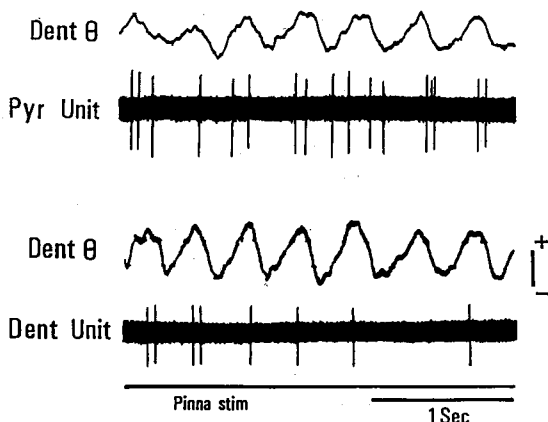


Fig. 12 Hippocampal theta units recorded during pinna stimulation. Upper unit was recorded around pyramidal cell layer, lower unit was recorded in the dentate gyrus.

れるとき、あるいは陽性のピーク付近で発射する傾向がみられた。これに対し、歯状回のユニットは、歯状回の θ 波が陽性に振れるとき(unit 2)、陽性のピーク付近(unit 1)、陽性のピークから陰性にふれるとき(unit 3)、および主に陰性の部位(unit 4)というように、種々の時期に発射が生じ一定の傾向は認められなかった。

4 考 察

4・1 海馬から導出記録される θ 波と層構造の関係

今回の海馬内から導出記録される θ 波と、層構造と対応させた実験成績から、海馬内の2か所で θ 波が大きな振幅で導出記録できることが確認された。即ち、錐体細胞層付近と歯状回の顆粒細胞層付近である。この成績はWinson,²⁾ Bland and Whishaw³⁾のラット、Green *et al.*⁴⁾、Bland *et al.*⁵⁾のラビット、Bland *et al.*⁶⁾のネコの例ともほぼ一致している。 θ 波の振幅は、錐体細胞層付近が100-200 μ V、歯状回では150-400 μ Vと歯状回のはうが比較的大きく導出記録された。このことは、第1報で報告したように、歯状回で θ 波が記録されやすかったこととも一致した。 θ 波が大きく導出記録されたのは、細胞層および樹状突起の密な部位であり、歯状回内でも、顆粒細胞層の向い合った中央部で θ 波の振幅が数十 μ V低下しているのが示された。錐体細胞層の下方は、樹状突起の疎な部位の放線状層(stratum radiatum)で、 θ 波のほとんど導出記録できない部位、いわゆるnull zoneが示された。

4・2 2か所で導出記録される海馬 θ 波の関係

4・2・1 1側の海馬内で θ 波の振幅の相関関係

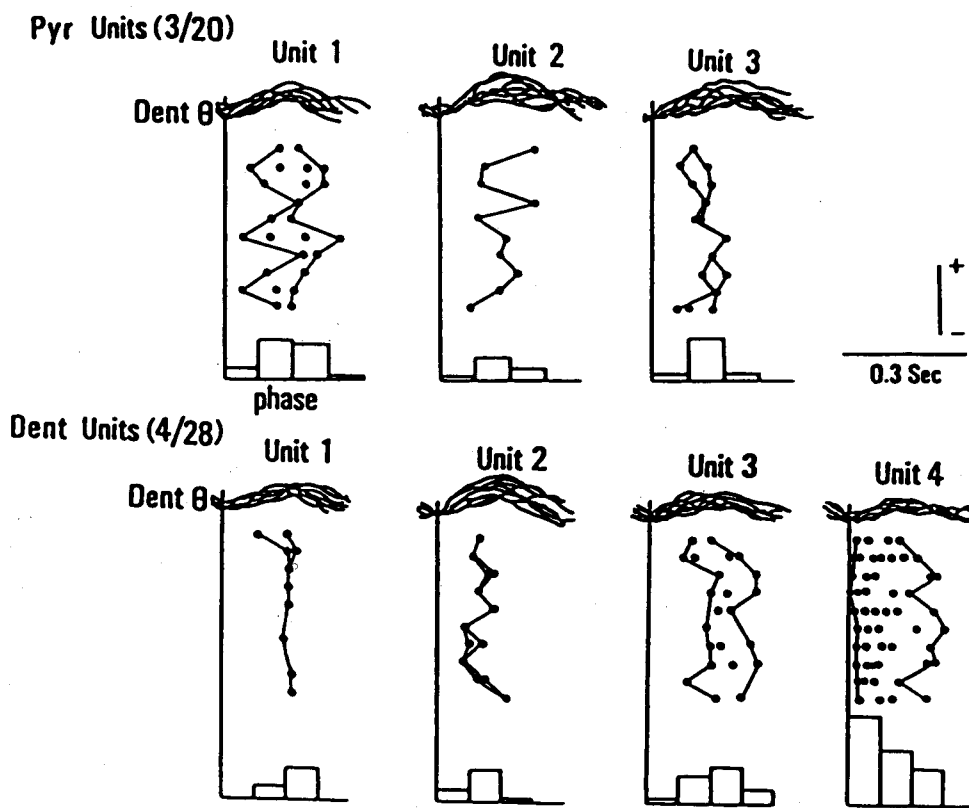


Fig. 13 Phase relationships between hippocampal theta waves and theta units. Vertical lines are drawn to the negative peak of the dentate theta waves which are superimposed ten traces. Theta units correspond to the theta waves are shown under the theta waves by raster display. Histogram are shown below each raster display. Upper 3 units were recorded around pyramidal cell layer, lower 4 units were recorded in the dentate gyrus.

海馬内では、歯状回の顆粒細胞は、苔状線維(mossy fiber)によってCA 3領域の錐体細胞に興奮性にシナプス接続し、その錐体細胞は、シェーファーの側枝(Schaffer collateral)でCA 1領域の錐体細胞の尖頭樹状突起に興奮性にシナプス接続する^{17,18)}。このように、歯状回の顆粒細胞と錐体細胞はシナプス接続をしているので、錐体細胞層付近の θ 波と、歯状回の θ 波の振幅が、相関を示すかどうかが問題となる。錐体細胞層付近の θ 波どうし、および歯状回の θ 波どうしの振幅の相関係数は $r=0.83$, $r=0.87$ と高い値を示した。つまり同じ層構造付近から記録される θ 波は、 θ 波のリズムも位相も一致して発見していることがわかる。しかし、逆転した位相を示す錐体細胞層付近の θ 波と歯状回の θ 波の振幅の相関係数は $r=0.12$ と相関関係は認められなかった。Whishaw¹⁹⁾はカイニン酸(kainic acid)を用いてCA 3, CA 4の錐体細胞を破壊しても、錐体細胞層付近と歯状回の2か所で記録される θ 波の

振幅と位相に変化を認めなかったことを報告している。今回の成績を含めると、歯状回の顆粒細胞からCA 1の錐体細胞への線維連絡の有無にかかわらず錐体細胞層付近と歯状回の2か所の θ 波は、振幅についてはそれぞれの部位での興奮レベルの変動により、独立して生起していると考えられその意味ではtwo generator hypothesisを支持する。

4・2・2 両側の海馬の θ 波の相関関係

海馬の対称的な左右の構造、および交連線維を介した対称的な接続²⁰⁻²²⁾から、左右の海馬 θ 波は、位相も同期し、振幅も相関関係が高いと予想された。位相に関しては、左右の錐体細胞層付近の θ 波どうし、および歯状回の θ 波どうしは同期し、同位相であった。これは、左右の海馬 θ 波のリズム発生源が共通であることを意味する。しかし、振幅に関して、左右の錐体細胞層付近の θ 波どうし、および歯状回の θ 波どうしの平均は $r=0.35$, $r=0.43$ で、1側の場合の平均 $r=$

0.83, $r=0.87$ に比較し、相関が低く、ある程度独立した振幅で変化しているとみなされた。その理由として、左右の海馬内の導出記録部位が完全に対応せず少しずれているために同期化の程度が低下した。あるいは、刺激部位が左右の中隔の1側であるため、海馬への入力に等しくならず相関が低くなった、などの可能性が考えられる。

4.3 海馬 θ 波の発現までの経過

海馬 θ 波の生じられる経過は、錐体細胞層付近と歯状回で顕著な相異を示した。中隔下部の連続電気刺激後、錐体細胞層付近は陽性に、歯状回では陰性に振れた。Fujita and Sakata²³⁾ および Leung²⁴⁾ はシェーファの側枝を、Alvarez-Leefmans and Gardner-Medwin¹¹⁾ は中隔に単発電気刺激を加えて、海馬への入力経路を刺激した。この結果、錐体細胞層の尖頭樹状突起と顆粒細胞層とその樹状突起の部位から陰性の電場電位を導出記録したことを報告している。この陰性の電場電位を示す部位は、今回、刺激後陰性に振れて、引きつづき θ 波が大きく導出記録された部位と一致した。一方、錐体細胞層付近は陽性の電場電位を示し、刺激後陽性に振れて、引きつづき θ 波が記録された部位と一致した。このことより、相反する電場電位は、錐体細胞の尖頭樹状突起を流入口(sink)とし、錐体細胞を流出口(source)とする双極子(dipole)を形成することで生じると考えられ²⁵⁾、位相の逆転した振れにも関与していることが推測された。

4.4 海馬 θ 波とニューロンのユニット発射活動

θ 波とニューロンの発射の時期について、Sinclair *et al.*²⁶⁾ Bland *et al.*⁸⁾ は、同じ部位で記録される θ 波の陰性の時期に発射することを報告している。今回、歯状回では、陰性の時期に主に発射したのは Fig. 13 の(unit 3, 4)で、(unit 1, 2)はむしろ陽性の時期であった。錐体細胞層付近のユニット発射は、歯状回の θ 波を基準として陽性の時期、これは錐体細胞層付近の θ 波の陰性の時期にあたるので、これまでの報告^{8, 26)} と一致した成績を示した。しかし、錐体細胞が双極子を形成し、錐体細胞層付近で逆転した位相を示すと考えると、この錐体細胞とみなされるユニットは、錐体細胞層付近の θ 波が陽性の時期に発射しなければならない。Fox *et al.*²⁷⁾ は錐体細胞層付近の θ 波が陽性の時期に発射の増加を報告している。ここで Buzsaki and Eidelberg²⁸⁾ は細胞の種類で発射する時期が異なることを報告しており、今回の私共の錐体細胞層付近のユニットおよび歯状回の(unit 1, 2)は、抑制性の介在ニューロンの可能性が考えられる。

これらの推測を確かめるためには、さらに個々のユニットの同定、および細胞内記録による膜電位の変化の測定などが必要となるであろう。

4.5 海馬 θ 波の発現機序

ここで、海馬 θ 波の発現のメカニズムを従来のデータと、今回の著者の実験成績を考慮して模式的に表わし Fig. 14 に示す。まず θ 波の位相については、錐体細胞の配列は、細胞体と樹状突起が一線上に存在して開電場(open field)を作り双極子を形成することができる。中隔からの入力に錐体細胞の尖頭樹状突起、および歯状回の顆粒細胞に興奮性にシナプス接続し、陰性の電場電位を示す流入口を形成する。錐体細胞の細胞体は流出口となり陽性の電場電位を生じる。一方、歯状回の顆粒細胞は苔状線維を有し、尖頭樹状突起をもつ錐体細胞のような明確な双極子を形成できない。そこで顆粒細胞は同一の電位変化を示す。錐体細胞の尖頭樹状突起と顆粒細胞が同期し、同一方向の電位変化を示すため、この部位で大きな振幅の θ 波を記録できると考えられる。腹側の顆粒細胞層では、顆粒細胞のみの電位変化のため振幅が低下し、顆粒細胞層の中央部で θ 波の振幅の低下を示すのも、この電場電位の勾配によると考えられる。位相が逆転した関係を保ちつつ、錐体細胞層と顆粒細胞層の2部位で独立した振幅

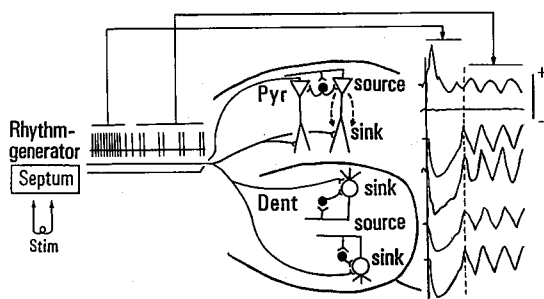


Fig. 14 Schematic model of hippocampal theta waves. The model assumes inputs from the rhythm generator in the septum are fed in to generate the theta rhythm in the hippocampus. Initial non-rhythmic input may produce reciprocal potential changes and rhythmic input to the pyramidal dendritic area and dentate granule cell may generate rhythmic synchronized theta waves. Dendritic excitation by input results in an active sink in the dendrites, accompanied by passive sources from the cell bodies, giving rise to dendritic negativity and somatic positivity. Dotted arrows indicate the current flow. Solid circles are inhibitory interneurons.

で θ 波が変化するのは、中隔からの興奮性入力の大きさと、両部位での反回抑制回路による興奮レベルの変化が加わるためであろう。

次に、 θ 波の 3-4 Hz のリズムの発現部位については、第 1 報で中隔下部に連続電気刺激を加えて θ 波を生起させることができたことから、中隔内よりむしろ海馬内にリズム発生装置があると考えた。しかし、今回の実験から、海馬内の 2 か所の θ 波は振幅は独立して変動するが、位相は逆転しているが完全に同期していることから、海馬外すなわち中隔内に共通のリズム発生装置が存在する可能性が大きい。この場合、中隔下部の連続電気刺激によって、実際に中隔から海馬に共通の律動的入力があるのかどうかは明らかでない。中隔下部電気刺激後 300-600 msec の期間が、刺激による陰性、陽性の相反する大きな電位変化に対応する。単純に考えると、その期間の後 3-4 Hz の規則的な θ リズムが中隔から海馬に入力し、共通の同期したリズムの θ 波が生起されるとみなされる。

5 結 論

海馬 θ 波の発現機序を知る目的で、第 1 報にひきつづき、 θ 波の生起部位と層構造の対応関係を調べた。2 か所で生起される θ 波について、さらに、発現の経過と位相、および振幅の相関関係について解析した。

1) ウレタン浅麻酔下に不動化したネコを用いて、体性感覚刺激、および中隔下部、視床下部に連続電気刺激を加え、海馬の錐体細胞層付近と歯状回の 2 か所から大きな振幅で θ 波を導出記録できた。その両部位の間に θ 波がほとんど記録できないいわゆる null zone があった。

2) マルチ電極で同時記録すると、約 3 Hz の海馬 θ 波は、錐体細胞層付近と歯状回で、位相が約 180 度逆転していた。

3) 生起された θ 波の振幅の相関係数は、錐体細胞層付近どうしの θ 波は $r=0.82-0.90$ 、歯状回の θ 波どうしは $r=0.81-0.92$ と高い相関を示した。位相の逆転した両部位の θ 波の振幅の相関係数は $r=0.01-0.3$ と相関を示さなかった。この成績より、海馬 θ 波は、錐体細胞層付近および歯状回の 2 か所で同期しているが、振幅は独立して発現していると考えられた。

4) 左右の海馬 θ 波の振幅の相関係数は、錐体細胞層付近どうしは $r=0.26-0.43$ 、歯状回どうしは $r=0.36-0.51$ であった。この成績より左右の海馬 θ 波はある程度独立して生起していると考えられた。

5) 中隔下部および視床下部の連続電気刺激で、錐

体細胞層付近は陽性に、歯状回は陰性にふれ、それぞれ数百 msec 後に θ 波となった。この時期は、リズム形成に要する時間と考えられた。

6) θ 波の位相と同期して発射活動するユニットの数は約 15% ($N=7/48$) だった。錐体細胞層付近は 3 ユニットとも、歯状回は 4 ユニットのうち 2 ユニットが同部位の θ 波の陰性のときに発射活動し、 θ 波の生起に関与していると考えられた。

これらの成績から、海馬内の錐体細胞層付近の θ 波と歯状回の θ 波は、中隔に存在する共通のリズム発生装置からの入力で引き起こされるとみなされ、リズムは同期しているが位相は逆転し、振幅は 2 か所で独立に変動して発現していることが明らかになった。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜った本生理学第 2 講座青木 藩教授に深謝いたします。また、ご協力いただきました黒沢洋一先生、大塚賢二先生ならびに教室員各位に感謝いたします。

References

1. 笠羽敏治, 黒沢洋一: ネコ海馬 θ 波の発現機序 第 1 報 中隔-海馬系の役割. 札幌医誌 53, 261-274 (1984).
2. Winson, J.: Hippocampal theta rhythm. I. Depth profiles in the curarized rat. Brain Res. 103, 57-70 (1976).
3. Bland, B. H. and Whishaw, I. Q.: Generators and topography of hippocampal theta (RSA) in the anaesthetized and freely moving rat. Brain Res. 118, 259-280 (1976).
4. Green, J. D. Maxwell, D. S. Schindler, W. J. and Stumpf, C.: Rabbit EEG "theta" rhythm: its anatomical source and relation to activity in single neurons. J. Neurophysiol. 23, 403-420 (1960).
5. Bland, B. H. Andersen, P. and Ganes, T.: Two generators of hippocampal theta activity in rabbits. Brain Res. 94, 199-218 (1975).
6. Bland, B. H. Sainsbury, R. S. and Creery, B. L.: Anatomical correlates of rhythmical slow wave activity (theta) in the hippocampal formation of the cat. Brain Res. 161, 199-209 (1979).
7. Winson, J.: Patterns of hippocampal theta rhythm in freely moving rat. Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol. 36, 291-301 (1974).
8. Bland, B. H. Andersen, P. Gane, T. and Sveen, O.: Automated analysis of rhythmicity of physiologically identified hippocampal formation neuron. Exp. Brain Res. 38, 205-219 (1980).

9. Fujita, Y. and Sato, T.: Intracellular records from hippocampal pyramidal cells in rabbit during theta rhythm activity. *J. Neurophysiol.* **27**, 1011-1025 (1964).
10. Eccles, J. C.: The physiology of synapses. 209-215, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1964).
11. Alvarez-Leefmans, F. J. and Gardner-Medwin, A. R.: Influences of the septum on the hippocampal dentate area which are unaccompanied by field potentials. *J. Physiol.* **249**, 14-16 (1975).
12. Andersen, P. Holmqvist, B. and Voorhoeve, P. E.: Entorhinal activation of dentate granule cells. *Acta Physiol. Scand.* **66**, 448-460 (1966).
13. Andersen, P. Holmqvist, B. and Voorhoeve, P. E.: Excitatory synapses on hippocampal apical dendrites activated by entorhinal stimulation. *Acta Physiol. Scand.* **66**, 461-472 (1966).
14. Kasaba, T. Ohtsuka, K. and Aoki, M.: The mechanisms of the hippocampal theta-generation in cats: two generator zones and correlations. *J. Physiol. Soc. Jpn. (Nippon Seirigaku Zasshi: Tokyo)* **46**, 394 (1984).
15. Kasaba, T. Kurosawa, Y. Ohtsuka, K. and Aoki, M.: Localization of generator zones and phase relations of hippocampal theta waves. *Neurosci. Lett. Suppl.* **17**, S39 (1984).
16. Snider, R. S. Niemer, W. T.: A stereotaxic atlas of the cat brain. The University of Chicago Press. (1970).
17. Brodal, A.: Neurological Anatomy. third edition. 673-676 New York Oxford University Press (1981).
18. Klemm, W. R.: Hippocampal EEG and information processing: a special role for theta rhythm. *Prog. Neurobiol.* **7**, 197-214 (1976).
19. Wishaw, I. Q. and Sutherland, R. J.: Sparing of rhythmic slow activity (RSA or theta) in two hippocampal generators after kainic acid CA 3 and CA 4 lesions. *Exp. Neurol.* **75**, 711-728 (1982).
20. Green, J. D. and Adey, W. R.: Electrophysiological studies of hippocampal connections and excitability. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* **8**, 245-262 (1956).
21. Gottlieb, D. I. and Cowan, W. M.: Autoradiographic studies of the commissural and ipsilateral association connections of the hippocampus and dentate gyrus of the rat. *J. Comp. Neurol.* **149**, 393-422 (1973).
22. Fricke, R. A. and Cowan, W. M.: An autoradiographic study of the commissural and ipsilateral hippocampo-dentate projections in the adult rat. *Comp. Neurol.* **181**, 253-270 (1978).
23. Fujita, Y. and Sakata, H.: Electrophysiological properties of CA 1 and CA 2 apical dendrites of rabbit hippocampus. *J. Neurophysiol.* **25**, 209-222 (1962).
24. Leung, L. S.: Orthodromic activation of hippocampal CA 1 region of the rat. *Brain Res.* **176**, 49-63 (1979).
25. 岡 宏: 大脳皮質誘発電位の成因, 神経研究の進歩 **23**, 234-248 (1979).
26. Sinclair, B. R. Seto, M. G. and Bland, B. H.: θ cells in CA 1 and dentate layers of hippocampal formation: relations to slow-wave activity and motor behavior in the freely moving rabbit. *J. Neurophysiol.* **48**, 1214-1225 (1982).
27. Fox, S. E. Wolfson, S. and Ranck, Jr. J. B.: Investigating the mechanisms of hippocampal theta rhythms: approaches and progress. In: Seifert, W. ed.: *Neurobiology of the Hippocampus*. 303-319, Academic Press, London (1983).
28. Buzsaki, G. and Eidelberg, E.: Phase relations of hippocampal projection cells and interneurons to theta activity in the anesthetized rat. *Brain Res.* **266**, 334-339 (1983).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学生理学第2講座 笠羽敏治